

A szív működés szabályozásával kapcsolatos ismereteink az elmúlt néhány évtized alatt nagymértékben kibővültek. A különböző szabályozó ágensek sejtszintű hatásmechanizmusának feltárásán túl számos új, eddig nem ismert - jelentős részben peptid-típusú - transzmitter azonosítása és hatásainak vizsgálata került előtérbe. Bár ezek tényleges fiziológiai szerepköre ma sem kielégítően tisztázott, hatékonyságuk exogén bevitel mellett nem vitatható, miokardiális előfordulásukat és képződésüket pedig sok adat bizonyítja. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban több ilyen ágens, így az endotelin-1, a nátriuretikus peptidek, a P-szubsztancia, a neuropeptid Y, bradikinin, endogén ouabain, adrenomedullin szív- és koronária hatásainak karakterizálását végezte. A farmako-fiziológiai vizsgálatok eredményeinek értékelésénél, a fiziológiai szerep megítélésénél azonban az egyik igen fontos és közvetlenül nehezen megválaszolható kérdés, hogy az adott ágens - normális vagy kóros körülmények között - milyen mennyiségben van jelen a hatás helyén, vagyis intramiokardiálisan - a szövetközi térben. A szabályozó működés valós feltérképezésénél további, alapvető fontosságú ismeret az is, hogy ezen anyagok hatásai milyen összefüggésben állnak egymással és más, klasszikusnak nevezhető regulátor ágensekével.

Jelen vizsgálataink kiindulópontját az a felismerés adta, mely szerint a szív által termelt több ágens jóval magasabb koncentrációban van jelen az intraperikardiális térben, mint a vérplazmában. Mi magunk vizsgálataink során kimutattuk, hogy mind humán, mind kutya perikardiális folyadékban a pitvari nátriuretikus peptid, az endotelin-1, a ferritin és az adenin nukleozidok koncentrációja a plazmáénak többszöröse. Miután a vizsgálok véleménye megegyezik abban, hogy a perikardiális térben lévő folyadék az intersticiális folyadéktérből származó transzszudátum, feltételezhető, hogy az abban található anyagok koncentrációi sokkal jobb közelítéssel tükrözik azok intramiokardiális szövetközi térben kialakuló koncentrációkat, vagyis azért a szöveti kompartmentét, amely a legtöbb kardiogén ágens tényleges hatóhelyét jelenti, és amelynek koncentráció-viszonyai a közvetlen, kvantitatív meghatározások számára nehezen hozzáférhetőek, vagy egyáltalán nem közelíthetők meg. Felmerült annak lehetősége, hogy a perikardiális folyadékban kimutatható endogén ágensek nem csupán jelzik képződésükben vagy felszabadulásukban lokálisan bekövetkező változásokat, hanem biológiailag aktív anyagok lévén, visszahathatnak a szív működésre valamint egymás hatásaira és képződésére is.

Ezért kísérletesen vizsgáltuk, hogy a perikardiális folyadéktérben kimutatható endogén regulátor ágensek megjelenése, koncentrációja dinamikusan változik-e a szívre rótt terhelés és az azt kísérő regulációs folyamatok aktivációja során, vagyis hogy a perikardiális tér valóságos, működő hatótér rész-e a szívben. Ezzel összefüggésben vizsgáltuk néhány fontos kardiogén szabályozó ágenseknek a perikardiális tér felől kiváltható hatásait és interakcióit.

Mivel a natív perikardiális transzudátum lassú utánképződése csak egyszeri mintában történő elemzést tesz lehetővé, a változások követésére az *in situ* kutyaszív zárt perikardiális zsákjának perfúziós-inkubációs kísérleti modelljét fejlesztettük ki. Ennek jellemzője, hogy többszörös mintavételt biztosít és hosszabb idejű, egyensúlyi változások követésére is alkalmas a keringésdinamika legfontosabb paramétereinek (artériás nyomás, bal kamrai kontraktilitás, szívfrekvencia) egyidejű mérése ill. standard EKG regisztrálása mellett.

A különböző vizsgálati szériákban a perikardiális folyadék és szisztémás artériás vérminták big endotelin-1, endotelin-1 (ET-1), atriális és B-típusú natriuretikus peptid (ANP, BNP) koncentrációit ELISA módszerrel, purin metabolit (adenozin, ADO; inozin, INO; és hipoxantin HXA) szintjeit HPLC-UV módszerrel mértük.

Első kísérleteinkben a vazospasztikus endotelin-1 és a vazodilatátor, kardioprotektív adenin nukleozidok között fennálló antagonizmust vizsgáltuk, melynek meglétét a koszorúér rendszerben az korábban feltártuk, működését jellemeztük.

E célból intrakoronáriásan adott endotelinnel (0.08 ± 0.02 nM) tartós koronária spazmust idéztünk elő, melynek során mértük a perikardiális folyadékminták ADO, INO és HXA koncentrációit. Az intraperikardiális (i.p.) folyadékminták teljes leszívásával (ezek rendre a natív perikardiális folyadék majd standard mennyiségű infuzátumok 15 perces inkubációi: kontroll és ET-1 utáni 10-20. perc voltak) párhuzamosan szisztémás artériás vérmintákat vettünk.

Megállapítottuk, hogy a fenti i.p. mintavételezési technika jól reprodukálható kontroll nukleozid értékeket nyújt. ET-indukált művi koronária spazmusban az infuzátum ADO, INO és HXA koncentrációi ugrásszerűen többszörösére emelkedtek, amit a vérnyomás és szívfrekvencia jelentős esése és szignifikáns ST eleváció kísért. A szisztémás vérminták purin metabolit koncentrációiban semmilyen változás nem következett be.

A továbbiakban az adenin nukleozidok és az endotelin-1 hatástani ellentétét oly módon vizsgáltuk, hogy a provokáló ágenszt (ET-1) közvetlenül a perikardiális térbe adtuk, vagyis az adenin nukleozid rendszer aktivációját a perikardiális tér felől kíséreltük meg. (Korábbi vizsgálatokban már igazolódott, hogy az ET-1 i.p. adva képes más, jellemző hatása – így pl. a közvetlen aritmogén hatás - kifejtésére.)

E vizsgálatokban a fentiekben ismertetett mérési és mintavételi feltételek mellett ET-1 i.p. (150 pmol/kg) adása előtt és után mértük az ADO, INO és HXA perikardiális koncentrációit. A kísérletekben az i.p. ET-1 hatását hosszabb időintervallumban, három, konsekutív módon vett 15 perces inkubációs mintában követtük.

Eredményeink szerint az ET-1 nagyságrendileg, 10- ill. 20-szorosára (ADO ill. INO) növelte a perikardiális infuzátum adenin nukleozid koncentrációit, míg azok plazmaértékei nem

változtak. Az i.p ET-1 vazokonstriktor hatásának kifejlődését szignifikáns ST eleváció jelezte, a szív működés és keringési paraméterek stabil értékei mellett.

Arra következtettünk, hogy a perikardiális folyadék (infuzátum) adenin nukleozid koncentrációinak változása jól követi a koronária metabolikus adaptációs mechanizmusok aktivációját a szívben, valamint, hogy a miokardiális az adenin nukleozid szabályozó rendszer a perikardiális tér felől (a vazospasztikus endotelin-1 i.p. adásával) éppúgy működésbe hozható, mint "hagyományosan", a koronária vaszkulatura felől előidézett szívishaemiában.

Vizsgáltuk a nátriuretikus peptidek (ANP, BNP) és az endotelin-1 kölcsönhatását az ismertett perikardiális vizsgálati modellben. Irodalmi adatok szerint az endotelin-1 (ET-1) az ANP képződés egyik fő regulátora a szívben. Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a miokardiális nátriuretikus peptidek felszabadulása aktiválható-e a perikardiális tér felől ET-1 adásával.

E célból in situ kutyaszíven (n=8) mértük az ANP és BNP koncentrációkat (ELISA) kontroll, majd ET-1 (150 pmol/kg i.p.) adása után vett három, egymást követő 15 perces perikardiális folyadék ill. perifériás vérmintában.

Az i.p. ET-1 stimulusra a perikardiális ANP koncentráció a 2. és a 3. mintában szignifikáns növekedést mutatott (kontroll vs. ANP₂ és ANP₃: 37±5 vs. 86±13 és 94±12 ng/ml, p₂ és p₃ < 0,02), míg a perikardiális BNP szintekben változás nem következett be (kontroll vs. BNP₂ és BNP₃: 21±2 vs. 20±2 és 21±3 ng/ml). Az artériás plazma ANP és BNP koncentrációk, ill. a hemodinamikai paraméterek az ip. ET-1 hatás alatt nem változtak.

Következtetésünk szerint az i.p. ET-1 szint növelése fokozza az ANP szívszöveti felszabadulását, amit a perikardiális ANP koncentrációk emelkedéseként igazoltunk. A miokardiális ANP és BNP stimulálhatóságának különbözősége felveti a két regulátor peptid perikardiális stimulusra való válasza időbeli eltéréseinek vagy akár az ANP-BNP felszabadulás, akár az ET-1 hatás más endogén ágensek (így adenin nukleozidok) általi modulációjának lehetőségét.

További kísérleteinkben vizsgáltuk adrenerg agonisták és az ET-1 feltételezett perikardiális interakcióját. Kiinduló-pontunk az volt, hogy – amint arra irodalmi adatok utalnak – ezen két, a kardiovaszkuláris szférában sok tekintetben rokon hatástani profilú anyagcsoport között felszabadulásukat nézve pozitív feed-back kapcsolódás áll fenn.

Ennek tanulmányozására az adrenerg receptorok legszélesebb skáláját aktiváló dopamin (DA) intraperikardiális hatásait jellemeztük dózis-hatás összefüggések formájában (0.06-8 µmol/kg, n=8; i.p.). A dopamin hatásokat noradrenalin (NA, 0.004-0.5 µmol/kg, n=8; i.p.) hatásokkal vetettük egybe. Az i.p. endothelin-1 szinteket minden DA dózis beadása után két konszekutív perikardiális infuzátum mintából ill. parallel plazmamintákból határoztuk meg.

Integratív regulációs elemként az adenin nukleozidok felszabadulását is vizsgáltuk a minták ADO és INO koncentrációinak mérése révén.

Eredményeink szerint az i.p. DA szignifikáns szívfrekvencia növekedést idézett elő ($HR_{DA,0.06-8}$: $+11 \pm 1$ - $+38 \pm 3$ szívütés/perc, $p < 0,05-0,01$), inotróp és vérnyomás válaszok megjelenése nélkül. Markáns kontraktilitás fokozódás (dp/dt_{max} : $+132 \pm 10$ %; $p < 0,05$) csak a vérnyomás hatással (BP: $+54 \pm 4$ Hgmm $p < 0,05$) párhuzamosan, a legnagyobb dózison lépett fel. A DA i.p. adása ET-1 felszabadulást indukált, ami az i.p. ET-1 szintet szignifikánsan növelte ($ET_{kontroll}$ vs. $ET_{DA,8}$: $14,3 \pm 0,1$ vs. $26,1 \pm 0,1$ pg/ml, $p < 0,001$), miközben az adenosin felszabadulás is jelentősen fokozódott ($ADO_{kontroll}$ vs. $ADO_{DA,8}$: $2,9 \pm 0,5$ vs. $11,1 \pm 3,0$ μ M, $p < 0,05$). Az i.p. NA kardiális hatásai igen hasonlóak voltak: a NA a perikardiális ET-1 koncentrációt szintén szignifikánsan fokozta, amit úgyszintén a perikardiális adenosin szint növekedésével járt együtt. Ugyanakkor a perifériás plazmaminták ET-1 és ADO koncentrációi nem követték a lokális (perikardiális) változásokat.

Megállapítottuk tehát, hogy a perikardiális térbe juttatott katekolaminok karakterisztikus hatásokat fejtenek ki, mind a kardiovaszkuláris válasz, mind az ET-1 ill. az ADO felszabadulás tekintetében. A perikardiális hatásprofil azonban jelentősen eltér az intravaszkuláris alkalmazás ismert hatás-arányaitól, melynek oka a perikardiális katekolaminok szív-szöveti diffúziójának/eliminációjának inhomogenitásában vagy a katekolaminra felszabaduló endotelin modulátor hatásaiban egyaránt kereshető. Ennek tisztázására további vizsgálatokban van lehetőség.

Különálló kísérletsorozatban tanulmányoztuk az eddig vizsgált ágensekkel többszörös kölcsönhatásban álló angiotenzin II (AT-II, 0.125 – 1.0 μ g/kg i.p.) perikardiális effektusait és hatását a perikardiális ET-1 és prekuzora, a big-ET-1 valamint az ANP, és proANP koncentrációkra ($n=8$).

Az eredmények szerint AT-II hatására a perikardiális big-ET-1 szint szignifikánsan növekedett (ET-1 max: 139 ± 28 pg/ml vs. 74 ± 12 pg/ml, $p < 0,02$), változatlan plazma big ET-1 és ET-1 szintek mellett. A perikardiális ET-1 koncentráció nem nőtt szignifikánsan. Ugyanakkor a proANP és ANP perikardiális szintje mintegy 50 %-os emelkedést mutatott, ami az ANP esetében szignifikánsnak bizonyult (ANPmax: $36,8 \pm 7,2$ vs. $24,4 \pm 3,6$ ng/ml, $p < 0,05$) a plazmakoncentrációk változása nélkül. A hemodinamikai paraméterek nem (HR), vagy csak kis mértékben (BP: $+11 \pm 2\%$, $p < 0,01$; dp/dt_{max} : $+10 \pm 3\%$, $p < 0,02$) változtak. Ugyanezen kísérletekben mintákat vettünk katekolaminok (noradrenalin és adrenalin) perikardiális és plazmakoncentrációjának mérésére is, ezek meghatározása folyamatban van. Következtetésünk szerint az angiotenzin II perikardiális koncentrációjának emelése hatékonyan stimulálja mind az ET-1 képződést és az ANP felszabadulást a szívben. Mivel a perikardiális big-ET-1 és ANP koncentrációk növekedése változatlan big-ET-1 és ANP plazmaszintek mellett és jelentősebb szisztémás hemodinamikai változások nélkül

következett be, ez a lokális válasz - legalábbis részben - független az AT-II hemodinamikai hatásaitól.

A tervezettek szerint vizsgáltuk, hogy a perikardiális tér valódi hatótérként viselkedik-e és az egyes ágensek koncentrációja elegendően nagy-e ahhoz, hogy hatásokat gyakoroljanak a szív működésre ill. a szív vérellátására. A kérdést elsőként a plazmában rendkívül bomlékony, alig néhány másodperces fél-életidejű adenin nukleozid, az adenzin és kardioaktív bomlásterméke az inozin perikardiális adása során vizsgáltuk, ezen ágensek perikardiális térből való eliminációjának és hatásainak tanulmányozása révén.

E célból altatott kutyákon 0.27-2.7-27 $\mu\text{g/g}$ szívtömeg ADO és 0.027-0.27-2.7 mg/g INO ip. adása ($n=7$) után 15 perces inkubációs periódusokkal vett mintákban mértük a perikardiumban visszamaradó adenzin és inozin koncentrációkat. A perikardiális elimináció adatait a szisztémás adás (ADO 0.27-2.7-27 mg/kg , INO 2.7-270 mg/kg , $n=5$, iv.) során mért plazmakoncentráció (a. carotis) változással ill. hemodinamikai hatásokkal vetettük egybe. Az eredmények szerint az ip. ADO koncentrációk az inkubációs periódus végére számottevően csökkentek, mégis, a nagyobb dózisok adásakor sokszorosan meghaladták a kontroll (K) értékeket (ADO_{0.27-2.7-27} vs. K: 1 ± 0.2 (ns), 12 ± 2 , 215 ± 33 vs. 0.8 ± 0.1 μM ; $p<0.05$). Perikardiális hatásként a szívfrekvencia kismérvű, de fenntartó csökkenését (HR $\Delta\%$: -1 ± 3 (ns), -3 ± 1 , -5 ± 2 ; $p<0.05$) regisztráltuk, sem a koronária áramlás, sem a kamrai kontraktilitás nem változott jellemzően. A nukleozid plazmaszintek nem változtak ip. adás esetén.

Intravénás adás során, 15 perc után, az ADO plazmakoncentrációja a gyakorlatilag a kiindulási értékre esett vissza (ADO_{0.27-2.7-27} vs. K: 0.2 ± 0.1 , 0.2 ± 0.1 , 0.7 ± 0.6 vs. 0.2 ± 0.03 μM ; ns). Ugyanakkor, a beadáskor az átmenetileg (fél-egy percre) megemelt iv. szintekre drasztikus hatások jelentek meg (HR $\Delta\%$: -8 ± 3 , -41 ± 7 , -51 ± 5 , $p<0.05$; BP $\Delta\%$: -28 ± 10 , -57 ± 5 , -64 ± 2 , $p<0.01$; dP/dt $\Delta\%$: 15 ± 9 n.s., -33 ± 4 , -50 ± 7 , $p<0.01$) melyek azonban a 15 perces vizsgálati periódus végére fokozatosan megszűntek.

Ugyanilyen eltéréseket találtunk az inozin perikardiális infuzátumból és plazmából való eliminációjának időbeliségében azzal a különbséggel, hogy a beadott inozinnak nagyobb hányada (40-50%-a) marad vissza a perikardiumban. A két nukleozid hasonlóképpen viselkedett a kardiovaszkuláris hatáserősség tekintetében is: perikardiálisan adva az inozin is csak kismérvű kontraktilitás változást okozott a szívfrekvencia változatlan volta mellett, míg intravénás bejuttatás esetén nagy szisztémás nyomáscsökkenést és kontrakciós erő fokozódást váltott ki.

Az intraperikardiálisan adott adenin nukleozidok plazmáénál sokszorta kisebb mérvű eliminációja, kiegyenlített kardiális hatása és a szisztémás hemodinamikai válaszok hiánya kardiális kórállapotokban - a kardioprotektív effektus érvényre jutása szempontjából - előnyös lehet.

További kísérletünkben az adenin nukleozidok és az endotelin-1 közötti kölcsönhatást vizsgálva, intraperikardiálisan adott adenin nukleozidok hatását tanulmányoztuk a perikardiális endotelin-1 szintekre ép vérellátású szíven. Korábbi eredményeink szerint az i.p. adott ET-1 szignifikánsan növeli az adenin nukleozidok koncentrációját a perikardiális térben. Jelen kísérletünkben i.p. adenozin és inozin hatását vizsgáltuk a perikardiális ET-1 szintekre. Az ADO (10-100-1000 μ M, n=8) és INO (1-10-100 mM, n=8) i.p. adása előtt és után – az eddigi mintavételezési protokollt követve - 15-15 perces inkubációt követően perikardiális folyadékmintákat ill. párhuzamosan perifériás artériás vérmintákat vettünk, melyekben mértük az ET-1 koncentrációkat. A hemodinamikai paramétereket folyamatosan regisztráltuk. Eredményeink szerint ADO és INO i.p. adására a perikardiális ET-1 koncentrációk szignifikánsan megemelkedtek (ET-1_{max, ADO}: +121 \pm 26%, p<0.02, ET-1_{max, INO}: +84 \pm 27%, p<0.05), míg az ET-1 plazmaszintek nem változtak. Az adenozin gyenge, de karakterisztikus szívfrekvencia csökkenést, az inozin mérsékelt kontraktilitás (dP/dt) növekedést váltott ki. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az adenin nukleozidok perikardiális koncentrációjának növelése endotelin felszabadulást indukál, ami a perikardiális endotelin koncentrációk szignifikáns növekedésében jelenik meg. Miután az endotelin szint növekedése, változatlan endotelin-1 plazmaszintek mellett és szisztémás hemodinamikai változások nélkül következett be, úgy gondoljuk, hogy az endotelin-1 felszabadulás lokális adenin-nukleozid hatás eredménye.

Az adenin nukleozid és endotelin-1 kölcsönhatás ezen elemét a kardiovaszkuláris rendszerben eddig még nem írták le. A hatás azonban nem teljesen ismeretlen az irodalomban, patkány pajzsmirigy sejteken találtak hasonló választ, ahol adenozin hatására A1 receptor által közvetített endotelin-1 felszabadulást tapasztaltak.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy ez az általunk kimutatott hatás az adenin nukleozid - endotelin-1 kölcsönhatások új eleme, és egyúttal eddig még nem ismert szabályozó mechanizmus része lehet a szívben.

Úgy véljük, mindezen eredmények alátámasztják azon felvetésünket, mely szerint a perikardiális tér a szív dinamikusan változó és funkcionálisan aktív kompartmentje, amely nem csak a miokardiális intersticium követőtereként, de hatékony endogén szabályozó ágensek hatótereiként is működhet a szívben. Reméljük, hogy az eredmények egyúttal hozzásegítenek a vizsgált kardioaktív ágensek fiziológiai és patofiziológiai jelentőségének pontosabb tisztázásához.